

免疫細胞活性化マーカーCD83を介したB-1 B細胞の機能調節メカニズム解析

著者	安藤 祐介
雑誌名	星薬科大学紀要
号	57
ページ	33-40
発行年	2015-12-10
URL	http://id.nii.ac.jp/1240/00000787/

免疫細胞活性化マーカー CD83 を介した B-1 B 細胞の 機能調節メカニズム解析

安 藤 祐 介

星薬科大学 微生物学教室

Analysis of ligands for CD83, a marker of activated immune cells

Yusuke ANDO

Department of Microbiology, Hoshi University

1. はじめに

免疫応答は、自己と非自己とを見分け、非自己を排除するシステムである。その応答の過程では、抗原によって刺激を受けた免疫細胞が、様々な補助刺激分子を発現することが知られている。その後、発現した補助刺激分子にそれぞれのリガンドが結合することによって、免疫細胞活性化の促進と抑制のバランスが調節され、免疫応答の方向性が決定されると考えられている¹⁾。本研究では、免疫応答の初期段階において抗原提示機能に重要な樹状細胞に発現する補助刺激分子 CD83 分子に着目し、そのリガンドやシグナル伝達について解析した。

2. CD83 について

CD83 は、免疫グロブリンスーパーファミリーに属する型膜貫通糖タンパク質である。CD83 の細胞表面での発現は、樹状細胞の成熟に伴って上昇するため、樹状細胞の成熟マーカーの 1 つとして用いられていた^{2, 3)}。しかし最近では、免疫応答により形成される胚中心リンパ球⁴⁾、サイトカイン刺激を受けた好中球^{5, 6)}、細菌の内毒素 (LPS) により刺激された単球やマクロファージ⁷⁾ など、活性化された多くの免疫細胞で発現が上昇することが確認されている。マウス CD83 は 196 アミノ酸残基で構成され、細胞外領域に存在する 2 残基のシステインの間で V タイプ免疫グロブリン様ドメインを形成している⁸⁾。細胞内にシグナル伝達に関わるリン酸化モチーフである ITAM や ITIM を持たないこともあり、刺激伝達の機序は不明である。

これまでに CD83 の機能としていくつかの報告がある⁹⁾。CD83 ノックアウトマウスでは、胸腺内および末梢血での CD4⁺ T 細胞の顕著な減少が認められ、胸腺上皮細胞に発現する CD83 が、CD4⁺CD8⁺ T 細胞から CD4⁺CD8⁻ T 細胞への分化に関係していることが示唆されている¹⁰⁾。一方、CD83 過剰発現マウスにおいては、

胸腺依存性抗原および胸腺非依存性抗原に対する抗体産生能が大幅に減少することや、インターロイキン 10 (IL-10) 産生が亢進することが報告されている^{11, 12)}。ヒトにおいては、リウマチ患者と健常者の SNPs を比較したゲノムワイド関連解析 (Genome Wide Association Study: GWAS) により、患者では CD83 遺伝子の一塩基多型 (SNP) が高頻度に認められ¹³⁾、また、多数のリウマチ患者の滑液中から可溶性 CD83 が検出されることが報告されている¹⁴⁾。これらの報告から、CD83 の発現が免疫応答の調節に大きな影響を与えていることが予想されるが、CD83 のリガンド分子が解明されていないため、詳細については未知の点が多い。最近では、可溶性 CD83 がリンパ球混合反応 (MLR) での T 細胞の増殖や、実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) を抑制することが報告されており、CD83 リガンドの同定により免疫制御の分子メカニズムについての新たな知見を見いだすことができると考えられた^{15, 16)}。

3. CD83 のリガンド発現細胞のスクリーニング

CD83 のリガンドを発現する細胞として、T 細胞、マクロファージ、樹状細胞が報告されている。CD83 がシアル酸に結合するという報告もあるが、リガンド分子の実体は不明である¹⁷⁻¹⁹⁾。本研究では、はじめに CD83 のリガンド発現細胞のスクリーニングを目的とし、マウス CD83 の細胞外ドメインとヒト IgG1 の Fc ドメインとの融合タンパク (mCD83-Fc) および GST (Glutathione *S*-transferase) との融合タンパク質 (GST-mCD83) を作製した。作製した融合タンパク質は、ブルダウンアッセイ、抗体アフィニティークロマトグラフィー、蛍光染色法、フローサイトメトリーなどに利用でき、リガンドの同定および精製、遺伝子クローニングなどに有用と考えられる。コントロールとして使用するヒト IL-2 のシグナルペプチドとヒト IgG1 の Fc ドメインとの融合タンパク質 Control-Fc も作製した。そ

それぞれの Fc ドメインとの連結部分には、フレキシブルなリンカーとして知られる 4 残基のグリシンと 1 残基のセリンの配列が 3 回繰り返される (Gly4Ser) \times 3 を挿入した (Figure 1A)。mCD83-Fc および Control-Fc は、発現プラスミドを HEK293FT 細胞に導入し、7 日後の培養上清より Protein A-Sepharose を用いて精製した (Figure 2A)。また、GST-mCD83 および GST は、それぞれの発現プラスミドを Rosetta-gami に導入し、IPTG でタンパク発現誘導後の菌体破碎液より Glutathione-Sepharose を用いて精製した (Figure 1B、2B)。

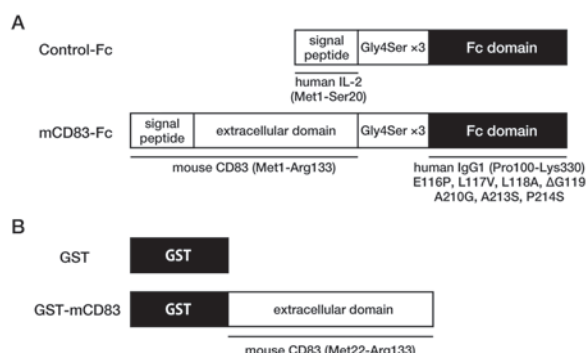


Figure 1. マウス CD83 (mCD83) と Fc あるいは GST との融合タンパク質の模式図

(A) Control-Fc および mCD83-Fc (B) GST および GST-mCD83

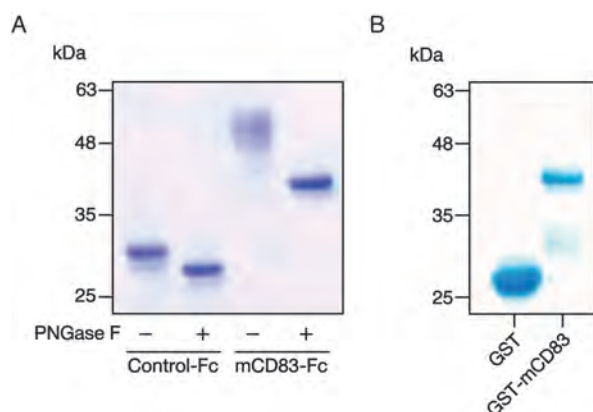


Figure 2. 精製 mCD83-Fc および GST-mCD83 の SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) による分析

(A) 精製後の mCD83-Fc および Control-Fc を還元条件下で SDS-PAGE により分離後 CBB 染色した。N-結合型糖鎖を切断する酵素 PNgase F により精製後の融合タンパク質を処理した図を示す。(B) 精製後の GST-mCD83 および GST を還元条件下で SDS-PAGE により分離後 CBB 染色した。

精製した融合タンパク質 mCD83-Fc を用いて、マウス免疫細胞を対象にリガンド発現細胞のスクリーニングを行った。C57BL/6N マウスより、脾細胞、骨髄細胞、胸腺細胞および腹腔内細胞を調製し、それらに対しての

mCD83-Fc の結合性をフローサイトメトリーにより評価した (Figure 3)。その結果、mCD83-Fc は、脾細胞、骨髄細胞、胸腺細胞に対しては結合がみられないが、腹腔内細胞の一部に対して結合が認められた。また、FSC/SSC プロットでの解析により、mCD83-Fc が結合する細胞集団は、単球や顆粒球ではなく、リンパ球であることが示唆された。

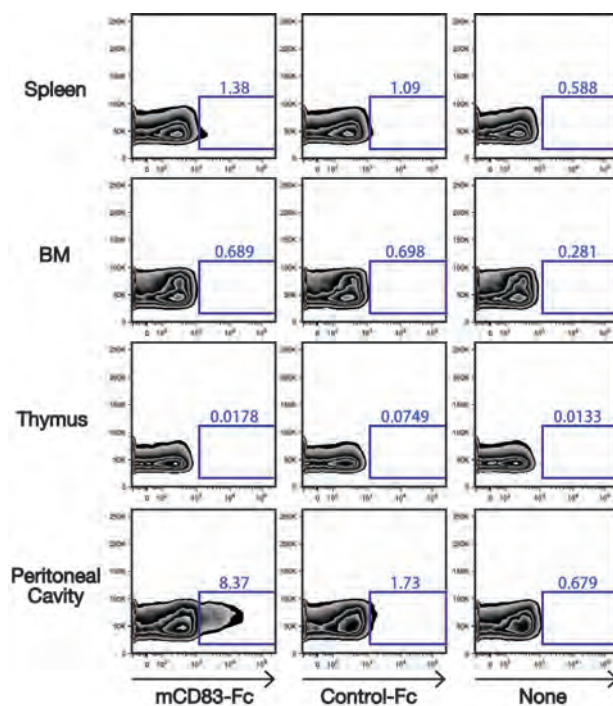


Figure 3. マウス免疫細胞に対する mCD83-Fc の結合性

脾細胞、骨髄細胞、胸腺細胞、および腹腔内細胞に対する mCD83-Fc の結合性をフローサイトメーター (FACS Verse) で解析した。対照として Control-Fc および PE 標識ヤギ抗ヒト Ig 鎖抗体のみ (None) による処理も行った。枠で囲んだ細胞の全細胞数に占める割合 (%) を示した。FSC/SSC ゲートによりリンパ球集団を選び、縦軸に SSC、横軸に PE の強度をプロットした。

次に、マウスの週齢による mCD83-Fc の結合する細胞集団の割合の変化を調べたところ、50 週齢のマウスと比べて、6 週齢のマウスから調製した腹腔内細胞ではより多くの細胞が結合した (Figure 4)。mCD83-Fc の結合性が加齢とともに大きく減少する一方で、Control-Fc の結合性ならびに PE 標識二次抗体の結合性には大きな変動がみられなかった。したがって、マウスの加齢による mCD83-Fc の結合性の変化は CD83 を介した結合性の変化によるものであることが示唆された。

これらの結果より、腹腔内に存在するリンパ球集団の一部は CD83 リガンド発現細胞であり、加齢によって CD83 リガンドの発現量が減少、あるいは CD83 リガンド発現細胞数が減少する可能性が考えられた。

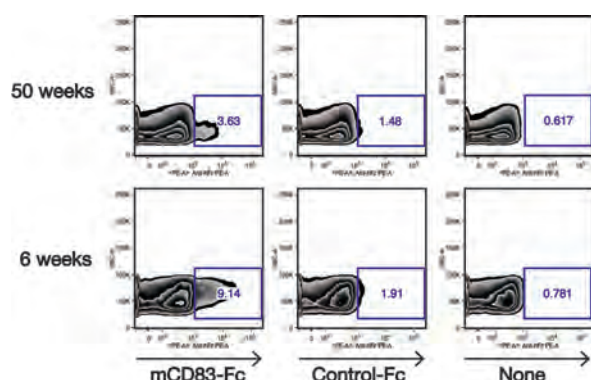


Figure 4. 腹腔内細胞に対する mCD83-Fc の結合性細胞とマウス年齢の関係

50 週齢および 6 週齢のマウス由来の腹腔内細胞の mCD83-Fc 結合性について Figure 3 と同様に解析した。縦軸に SSC の強度、横軸に PE の強度をプロットした。

4. mCD83-Fc 結合細胞の細胞表面マーカーの解析

mCD83-Fc 結合性の腹腔内細胞集団の表面マーカーを調べた。マウスの腹腔内に存在する細胞は、主に B 細胞や T 細胞、マクロファージであるが、リンパ球の一部に mCD83-Fc が結合することが確認されたので、T 細胞と B 細胞の細胞表面マーカーに対する抗体で染色した。腹腔内に存在するリンパ球の種類とそれらの細胞表面マーカーを Table 1 に示した²⁰⁾。抗 CD4、抗 IgM、抗 B220、抗 CD11b 抗体により解析したところ、mCD83-Fc が結合する細胞は IgM^{hi}、B220^{int}、CD11b⁺ であり (Figure 5)、すなわち B-1 B 細胞と呼ばれる細胞集団であることが示唆された。そこで、B 細胞の亜集団 (B-1 B 細胞と B-2 B 細胞) に対して mCD83-Fc の結合性をみたところ、mCD83-Fc は B-1 B 細胞および B-2 B 細胞の一部に結合し、mCD83-Fc 結合性の細胞は B-1 B 細胞に高い割合で含まれていることが明らかとなった (Figure 6)。

Table 1. 腹腔内のリンパ球とその表面マーカー

細胞	細胞表面マーカー
B-1a B細胞	IgM ^{hi} 、B220 ^{int} 、CD23 ⁺ 、CD11b ⁺ 、CD5 ⁺
B-1b B細胞	IgM ^{hi} 、B220 ^{int} 、CD23 ⁺ 、CD11b ⁺ 、CD5 ^{int}
B-2 B細胞	IgM ^{int} 、B220 ^{hi} 、CD23 ⁺ 、CD11b ⁺ 、CD5 ⁺
CD4 T細胞	IgM ⁻ 、B220 ⁻ 、CD23 ⁺ 、CD11b ⁺ 、CD4 ⁺

マウスの系統により腹腔内に存在する B-1 B 細胞数が異なることが報告されている²¹⁾。BALB/c マウスおよび C57BL/6N マウスの腹腔細胞の B-1 B 細胞の割合を調べてみると、以前の報告のように BALB/c マウスでは C57BL/6N マウスに比べ、B-1 B 細胞の割合が高い

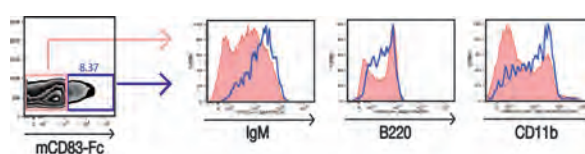


Figure 5. mCD83-Fc 結合性細胞の表面マーカー解析

腹腔内の mCD83-Fc 結合細胞 (実線) および非結合細胞 (塗りつぶし) の IgM、B220 および CD11b の発現量をフローサイトメトリーにより解析した。横軸は蛍光強度、縦軸は細胞数 (相対値) をそれぞれ表す。

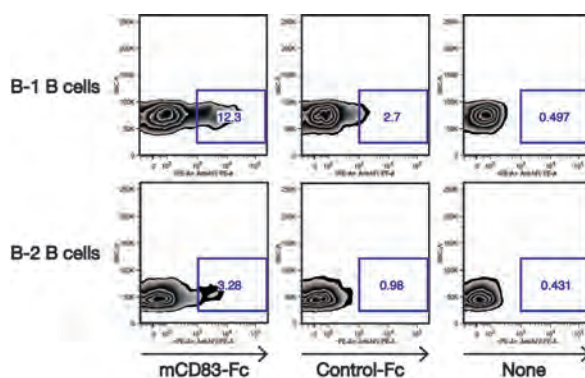


Figure 6. B-1 B 細胞および B-2 B 細胞への mCD83-Fc の結合性

マウス腹腔内由来 B-1 B 細胞および B-2 B 細胞に対する mCD83-Fc の結合性をフローサイトメトリーで解析した。対照として Control-Fc および PE 標識ヤギ抗ヒト IgG 鎖抗体 (None) を用いた。B-1 B 細胞集団 (IgM^{hi}B220^{int}CD11b⁺) および B-2 B 細胞集団 (IgM^{int}B220^{hi}CD11b⁺) に、それぞれゲートをかけ解析した。

ことが確認された (Figure 7A)。mCD83-Fc 結合性の細胞の存在比にも差異があることが予想されたので、それぞれの系統の 6 週齢のマウスから腹腔内細胞を調製し、mCD83-Fc の結合する細胞の割合について調べた。その結果、B-1 B 細胞集団のうち、BALB/c マウスでは 21.5%、C57BL/6N マウスでは 12.8% が mCD83-Fc 結合性の細胞であり、BALB/c マウスにおいて約 2 倍高いことがわかった (Figure 7B)。

B-1 B 細胞は、CD5 の発現量により CD5⁺ である B-1a B 細胞と CD5^{lo} である B-1b B 細胞とに大別される。両系統のマウスの腹腔内細胞のうち B-1 B 細胞に占める B-1a および B-1b B 細胞の割合を調べてみると、BALB/c マウスでは C57BL/6N マウスに比べ、B-1a B 細胞の割合が約 2 倍であり、一方 B-1b B 細胞の割合が約 1/2 倍であった (Figure 7A)。これらの結果は、BALB/c マウス腹腔内細胞において B-1a B 細胞の比率が高いことおよび高頻度に mCD83-Fc 結合細胞が存在することの相関性を示すものであり、mCD83-Fc に高い親和性を有する細胞集団は主に B-1a B 細胞である可能性が考えられた。

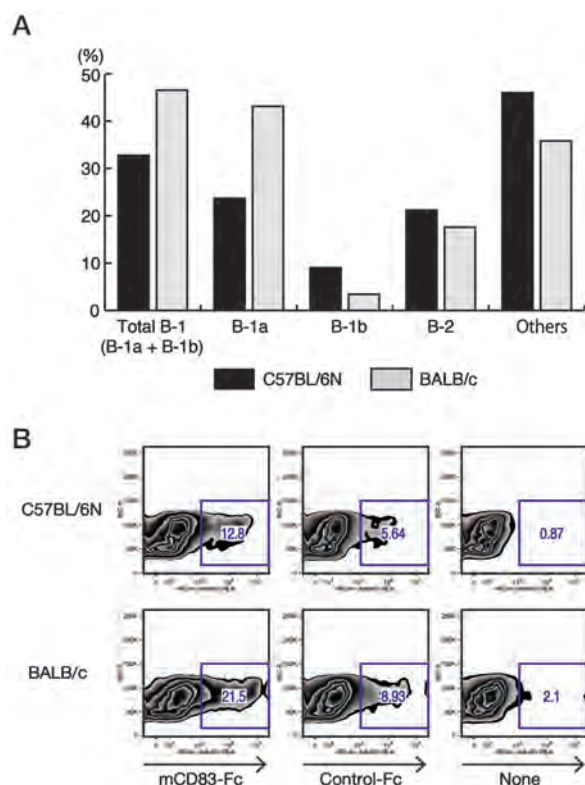


Figure 7. C57BL/6N および BALB/c マウスの腹腔内細胞への mCD83-Fc の結合性

(A) C57BL/6N および BALB/c マウス由来の腹腔内細胞における B-1 B 細胞および B-2 B 細胞の占める割合を示した。IgM⁺B220⁺ の細胞集団以外を B 細胞とし、Table 1 に示す表面マーカーに従い、B-1a B 細胞、B-1b B 細胞、B-2 B 細胞の割合をそれぞれ推定した。(B) C57BL/6N および BALB/c マウス由来の腹腔内細胞に対する mCD83-Fc 結合性を Figure 3 と同様にフローサイトメトリーにより解析した。

5. CD83 リガンド発現 B 細胞株のスクリーニング

mCD83-Fc が腹腔内の B 細胞、特に IgM^{hi}B220^{int}CD11b⁺ B-1 B 細胞に結合することが明らかになったので、マウス B 細胞を由来とする 7 種類の細胞株への結合性を調べた。7 種類の B 細胞株のうち、BCL1 細胞株の垂株 3 種類および CH27 は B-1 B 細胞、BAL-17、WEHI231、PAI は B-2 B 細胞由来である。その結果、mCD83-Fc は、B-1 B 細胞を由来とする BCL1 細胞株の垂株 3 種類、BCL1-B20、BCL1-CW13.20、BCL1-5B1b に結合し、その程度は BCL1-B20>BCL1-CW13.20>BCL1-5B1b の順であることが明らかとなった (Figure 8)。B-1 B 細胞由来の細胞株に mCD83-Fc が結合するという結果は、腹腔の B-1 B 細胞の一部が mCD83-Fc に高親和性を示すことと一致するものであった。また、mCD83-Fc の BCL1-B20 細胞への結合は、GST-mCD83 の存在下で競合的に阻害されたことから、CD83 の特異的結合であることが確認された (Figure 9)。

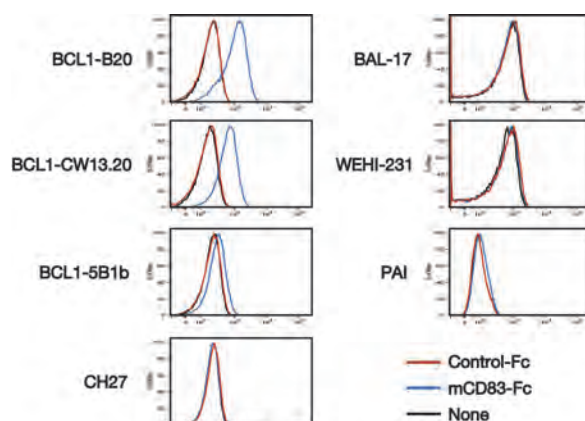


Figure 8. マウス B 細胞株に対する mCD83-Fc の結合性

7 種類のマウス B 細胞株に対しての mCD83-Fc の結合性をフローサイトメトリーで解析した。Control-Fc の結合性 (赤色の実線)、mCD83-Fc の結合性 (青色の実線)、PE 標識ヤギ抗ヒト IgG 鎖抗体の結合性 (黒色の実線) をそれぞれ示した。

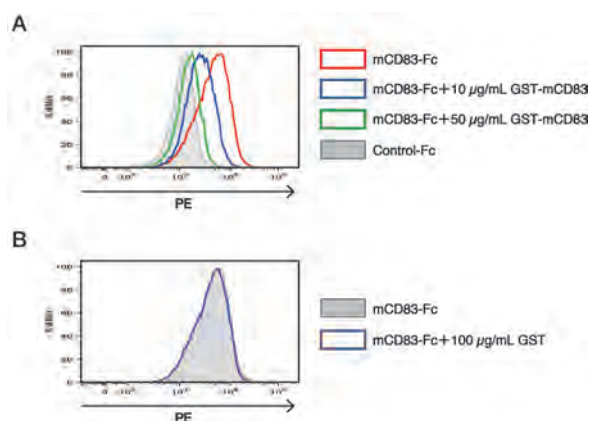


Figure 9. BCL1-B20 細胞への mCD83-Fc の結合に及ぼす GST-mCD83 の影響

GST-mCD83 (10 または 50 μg/mL) 存在下 (A) あるいは GST (100 μg/mL) 存在下 (B) における mCD83-Fc の BCL1-B20 細胞に対する結合性をフローサイトメトリーにより解析した。

B 細胞は、自然免疫で働く B-1 B 細胞と獲得免疫で働く B-2 B 細胞とに大別される^{20, 22, 23)}。B-1 B 細胞は胎児期の肝臓において産生され、生体においては自己増殖によりその数を維持しており、一方、B-2 B 細胞は出生以降骨髄において生涯産生され続けるとされている。しかしながら、B-1 B 細胞は由来や機能、細胞表面マーカーについて未だ不明な点も多く、mCD83-Fc の結合性の違いにより B-1 B 細胞を新たに特徴づけられる可能性が考えられた。

6. CD83 のリガンド分子の同定

mCD83-Fc 高結合株であった BCL1-B20 細胞を用いて CD83 のリガンド分子の同定を目的に研究を進めた。

BCL1-B20 細胞より粗膜画分懸濁液を調製し、mCD83-Fc および Control-Fc により粗膜画分懸濁液中から沈降されてくるタンパク質を SDS-PAGE で分離後、銀染色により検出、比較した。その結果、Control-Fc では沈降されないが、mCD83-Fc により沈降する 75 kDa のタンパク質が検出された (Figure 10A)。沈降した 75 kDa のタンパク質について、MALDI-TOF-MS による PMF 解析および MS/MS 解析を行ったところ、マウス IgM の重鎖 (μ 鎖) であることがわかった。また、抗マウス IgM 抗体を用いたウエスタンブロットによっても、 μ 鎖が mCD83-Fc により特異的に沈降されてくることが確認された (Figure 10B)。次に、mCD83-Fc の BCL1-B20 細胞に対する結合に関わる μ 鎖の寄与を調べるために、抗 IgM 抗体の影響を調べた。その結果、BCL1-B20 細胞をあらかじめ抗 IgM ポリクローナル抗体で処理することにより、mCD83-Fc の結合が阻害されることがわかった (Figure 11)。これらの結果より、CD83 が BCL1-B20 細胞の IgM を介して結合している可能性が示された。

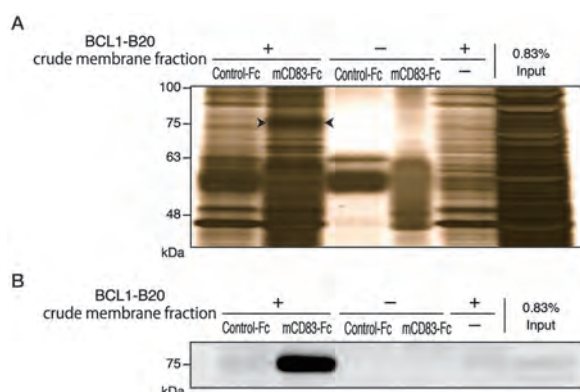


Figure 10. mCD83-Fc により沈降される BCL1-B20 細胞のタンパク質

BCL1-B20 細胞より調製した粗膜画分懸濁液中から、mCD83-Fc および Control-Fc によって沈降されてきたタンパク質を SDS-PAGE (7.5%ゲル) により分離し、銀染色 (A) あるいは抗 IgM 抗体によるウエスタンブロット (B) を行った。対照として、粗膜画分を加えないもの (左から 3、4 レーン目)、Protein G-Dynabeads に粗膜画分を加えたもの (左から 5 レーン目)、ならびに粗膜画分 (反応に用いた量の 0.83% に相当する量、左から 6 レーン目) も泳動した。矢頭は、mCD83-Fc によって特異的に沈降された 75 kDa のタンパク質を示す。

続いて、mCD83-Fc の高結合株である BCL1-B20 細胞と低結合株である BCL1-5B1b 細胞との間に、mCD83-Fc によって沈降されてくる μ 鎖に違いがあるかを調べた。その結果、BCL1-B20 細胞の粗膜画分懸濁液中から沈降されてくる μ 鎖の量に比べ、BCL1-5B1b 細胞から沈降されてくる μ 鎖の量が少ないことが明らかとなった (Figure 12A)。また、抗マウス IgM

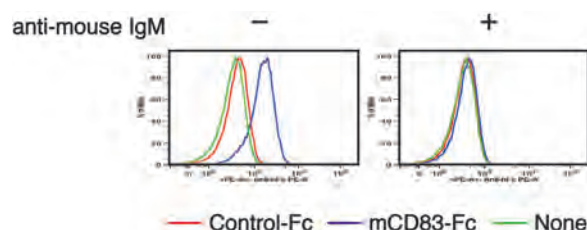


Figure 11. 抗 IgM ポリクローナル抗体による mCD83-Fc の結合の阻害

BCL1-B20 細胞を抗 IgM 抗体 (20 μ g/mL) の存在下または非存在下で、氷上にて 30 分間静置した。それぞれの細胞に対しての mCD83-Fc (赤色の実線)、Control-Fc (青色の実線) および PE 標識ヤギ抗ヒト Ig μ 鎖抗体 (緑色の実線) の結合性をフローサイトメトリーで解析した。

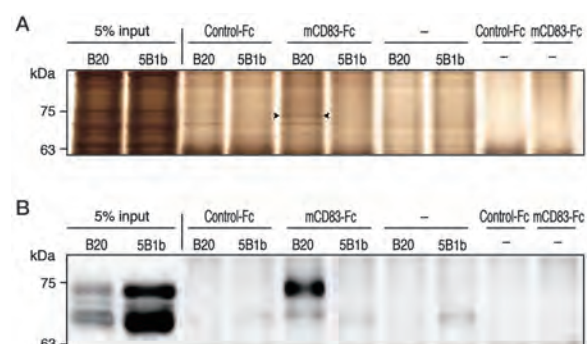


Figure 12. mCD83-Fc により沈降されたタンパク質の比較

BCL1-B20 細胞および BCL1-5B1b 細胞より調製した粗膜画分懸濁液中から、mCD83-Fc および Control-Fc によって沈降されたタンパク質を SDS-PAGE (7.5%ゲル) により分離し、銀染色 (A) ならびに抗 IgM 抗体によるウエスタンブロット (B) を行った。対照として、粗膜画分を加えないもの (左から 9、10 レーン目)、Protein G-Dynabeads に粗膜画分を加えたもの (左から 7、8 レーン目)、粗膜画分 (反応に用いた量の 5% に相当する量、左から 1、2 レーン目) も泳動した。矢頭は、mCD83-Fc によって特異的に沈降された μ 鎖を示す。

抗体を用いたウエスタンブロットによっても、BCL1-5B1b 細胞の粗膜画分懸濁液中から沈降されてくる μ 鎖はきわめて少ないことが確認された (Figure 12B)。この結果から、BCL1-B20 細胞に比べ BCL1-5B1b 細胞では IgM の発現量が少ないことが予想されたが、フローサイトメトリーにより IgM の発現量を測定したところ、予想に反して BCL1-5B1b の IgM の発現量は、BCL1-B20 細胞に比べ高いことがわかった (Figure 13)。抗 IgM 抗体の前処理により mCD83-Fc の結合が阻害されるが、細胞表面の IgM の発現量と mCD83-Fc の結合性との間には相関がみられないことから、両細胞に発現する IgM に質的な差異が存在することが考えられた。例えば、CD83 に対して高親和性および低親和性の IgM が存在し、CD83 が B-1 B 細胞のユニークな IgM を認識して結合している可能性等が推測された。

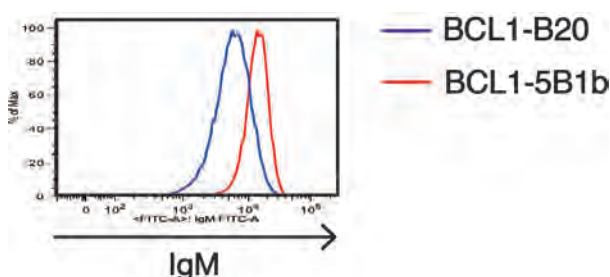


Figure 13. BCL1-B20 細胞と BCL1-5B1b 細胞における IgM 発現量の比較

(青：BCL1-B20 細胞の IgM の発現量 赤：BCL1-5B1b 細胞の IgM の発現量)

7. mCD83-Fc が結合する IgM の解析

BCL1-B20 細胞に発現する IgM をウエスタンブロットで分析すると 2 本のバンドが確認され、これらのうち、高分子量側の IgM が mCD83-Fc により選択的に沈降されることが明らかとなった (Figure 12B)。そこで、これら 2 種類の IgM の相違が何に由来するのかを解析した。

CD83 が糖鎖末端に存在するシアル酸を認識しているという報告¹⁹⁾や、IgM が N-結合型糖鎖修飾を受けるとの報告²⁴⁾から糖修飾に着目した。BCL1-B20 細胞の細胞溶解液をペプチド-N-グリコシダーゼ (PNGase F) またはノイラミナーゼで処理した後、抗 IgM 抗体を用いたウエスタンブロットにより解析すると、いずれの酵素処理においても IgM の泳動度に変化が見られたが、1 本のバンドに収束することはなく、少なくとも 2 種類の IgM の存在が観察された (Figure 14A)。この結果より、高分子量および低分子量の IgM は、いずれも N-結合型糖鎖およびシアル酸の修飾を受けているが、両者の相違が異なる糖鎖修飾に起因する可能性は低いと思われる。

細胞膜結合型 IgM は、スフィンゴ脂質、コレステロール、シグナル伝達分子などが集積し形成される脂質ラフト (Lipid Raft) と呼ばれるマイクロドメインに存在することが知られている^{25, 26)}。そこで、BCL1-B20 細胞よりシヨ糖密度勾配遠心法により脂質ラフト画分を分離し、ウエスタンブロットで解析したところ、高分子量側の IgM の濃縮が認められた (Figure 14B)。この結果から、mCD83-Fc は、脂質ラフトを形成する IgM に選択的に結合することが示唆された。脂質ラフトは、スフィンゴ脂質が集積した膜のドメインであることから、CD83 が IgM およびスフィンゴ脂質を含む複合体を認識している可能性も考えられた。

8. まとめ

本研究により以下のことが明らかとなった。(1)

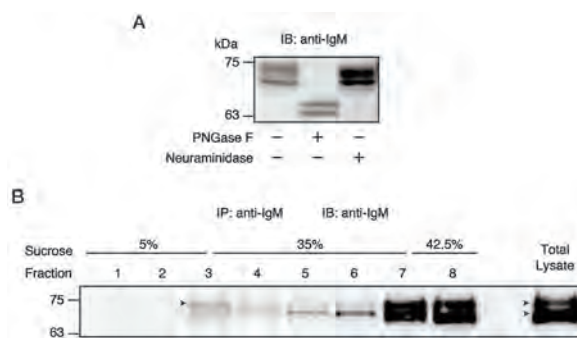


Figure 14. BCL1-B20 細胞における IgM の解析

(A) BCL1-B20 細胞の細胞溶解液を PNGase F またはノイラミナーゼにより処理後、SDS-PAGE (7.5 %ゲル) により分離し、抗 IgM 抗体によるウエスタンブロットを行った。(B) BCL1-B20 細胞を 0.1 % Triton X-100 を含む緩衝液で 4 、30 分の条件で可溶化した。得られた細胞溶解液を 5 %、35 %、42.5 %シヨ糖の不連続密度勾配超遠心 (200,000 xg、4 、16 h) により分離し、上部より 600 μ L ずつ回収した (画分 1 ~ 8)。抗 IgM 抗体を用いて各画分に含まれる IgM を沈降させた後、ウエスタンブロットにより IgM を検出した。脂質ラフトのマーカー分子である Caveolin-1 の分布より、脂質ラフトは画分 3 に濃縮されていると考えられる。

mCD83-Fc は、腹腔内細胞の一部に結合し、その大部分は B 細胞であり、特に B-1 B 細胞と呼ばれる亜集団に結合した。(2) mCD83-Fc は、B-1 B 細胞由来である BCL1-B20 細胞株の 3 種類の亜株に結合し、結合性は BCL1-B20 > BCL1-CW13.20 > BCL1-5B1b であった。(3) BCL1-B20 細胞の粗膜画分から mCD83-Fc により IgM の μ 鎖が沈降されるが、BCL1-5B1b 細胞の粗膜画分からは、ほとんど沈降されなかった。しかしながら、両細胞の IgM の発現量とは相関しなかった。(4) mCD83-Fc は、BCL1-B20 細胞の粗膜画分から、高分子量側の IgM を選択的に沈降し、この IgM は脂質ラフトを含む画分に回収された。

免疫細胞の活性化に伴い CD83 が発現することから、免疫反応が活発に起こる組織での B-1 B 細胞との相互作用が予想される。B-1 B 細胞については、脾臓に少数存在する CD5⁺ B-1 B 細胞をマウスに移入することにより、EAE の進行が抑えられること²⁸⁾、B-1 B 細胞が制御性 B 細胞の前駆細胞になり得ること²⁹⁾、腹腔内 B-1 B 細胞は、生体内における主要な IL-10 産生細胞であることが報告されている³⁰⁾。また、CD83 のトランスジェニックマウスにおいて、抗体産生の抑制および IL-10 の産生増強が報告されていること^{11, 12)}から、CD83 発現細胞が B-1 B 細胞と相互作用することにより、IL-10 産生を通じて免疫反応を負に制御している可能性が考えられる。また、B-1 B 細胞は胸腺に移行することも知られているため³¹⁾、CD83 ノックアウトマウスで見られる T 細胞の分化障害の原因は、本来 CD83

発現細胞である胸腺上皮細胞と B-1 B 細胞の相互作用の不全による可能性も考えられる。

本研究により、mCD83-Fc に対して高親和性の IgM と低親和性の IgM の存在が明らかとなった。両者は SDS-PAGE での移動度に違いが見られるが、化学的な性質の差異については現在のところ不明である。また、BCL1-B20 細胞および BCL1-5B1b 細胞での IgM の発現量と mCD83-Fc の反応性に必ずしも相関性がないことから、構造的にユニークな IgM が CD83 を認識している可能性がある。B-1 B 細胞は、自己や病原体に対する抗体を抗原の有無に関わらず常に産生していることが知られており、T 細胞のマーカーとして知られる Thy-1 抗原の場合には、自己抗原として B-1 B 細胞に認識されることがある³²⁾。CD83 の場合も同様の機序により B-1 B 細胞に認識される可能性が考えられる。また、CD83 に親和性の高い IgM は、脂質ラフトに局在

していることから、CD83 高親和性 IgM を持つ B-1 B 細胞が活性化免疫細胞に対して CD83 を介した細胞機能調節シグナルを伝達していることが考えられる。今後、mCD83-Fc 結合細胞と非結合細胞を分取し、両細胞の性質の違いを明らかにしていくとともに、CD83-CD83 リガンドを介したシグナル伝達の観点から、B-1 B 細胞と CD83 の相互作用が免疫応答に与える影響を解明していきたいと考えている。

謝辞

本研究に対し、平成 26 年度星薬科大学大谷記念研究助成金を賜りましたことを大谷卓男理事長ならびに田中隆治学長に深く感謝申し上げます。また、本研究を遂行する機会および数々の有益なご助言をいただいた星薬科大学微生物学教室辻勉教授、築地信准教授、奥輝明助教に厚く御礼申し上げます。

参考文献

- 1) Zhu, Y., Yao, S., and Chen, L. (2011) *Immunity* **34**, 466-478
- 2) Zhou, L. J., and Tedder, T. F. (1995) *J. Immunol.* **154**, 3821-3825
- 3) Berchtold, S., Muhl-Zurbes, P., Heufler, C., Winklehner, P., Schuler, G., and Steinkasserer, A. (1999) *FEBS Lett.* **461**, 211-216
- 4) Kozlow, E. J., Wilson, G. L., Fox, C. H., and Kehrl, J. H. (1993) *Blood* **81**, 454-461
- 5) Yamashiro, S., Wang, J. M., Yang, D., Gong, W. H., Kamohara, H., and Yoshimura, T. (2000) *Blood* **96**, 3958-3963
- 6) Iking-Konert, C., Wagner, C., Deneffle, B., Hug, F., Schneider, M., Andrassy, K., and Hansch, G. M. (2002) *Clin. Exp. Immunol.* **130**, 501-508
- 7) Cao, W., Lee, S. H., and Lu, J. (2005) *Biochem. J.* **385**, 85-93
- 8) Twist, C. J., Beier, D. R., Distech, C. M., Edelhoff, S., and Tedder, T. F. (1998) *Immunogenetics* **48**, 383-393
- 9) Breloer, M., and Fleischer, B. (2008) *Trends Immunol.* **29**, 186-194
- 10) Fujimoto, Y., Tu, L., Miller, A. S., Bock, C., Fujimoto, M., Doyle, C., Steeber, D. A., and Tedder, T. F. (2002) *Cell* **108**, 755-767
- 11) Breloer, M., Kretschmer, B., Luthje, K., Ehrlich, S., Ritter, U., Bickert, T., Steeg, C., Fillatreau, S., Hoehlig, K., Lampropoulou, V., and Fleischer, B. (2007) *Eur. J. Immunol.* **37**, 634-648
- 12) Kretschmer, B., Luthje, K., Guse, A. H., Ehrlich, S., Koch-Nolte, F., Haag, F., Fleischer, B., and Breloer, M. (2007) *PLoS ONE* **2**, e755
- 13) Okada, Y., Terao, C., Ikari, K., Kochi, Y., Ohmura, K., Suzuki, A., Kawaguchi, T., Stahl, E. A., Kurreeman, F. A., Nishida, N., Ohmiya, H., Myouzen, K., Takahashi, M., Sawada, T., Nishioka, Y., Yukioka, M., Matsubara, T., Wakitani, S., Teshima, R., Tohma, S., Takasugi, K., Shimada, K., Murasawa, A., Honjo, S., Matsuo, K., Tanaka, H., Tajima, K., Suzuki, T., Iwamoto, T., Kawamura, Y., Tanii, H., Okazaki, Y., Sasaki, T., Gregersen, P. K., Padyukov, L., Worthington, J., Siminovich, K. A., Lathrop, M., Taniguchi, A., Takahashi, A., Tokunaga, K., Kubo, M., Nakamura, Y., Kamatani, N., Mimori, T., Plenge, R. M., Yamanaka, H., Momohara, S., Yamada, R., Matsuda, F., Yamamoto, K. (2012) *Nat. Genet.* **44**, 511-516
- 14) Hock, B. D., O'Donnell, J. L., Taylor, K., Steinkasserer, A., McKenzie, J. L., Rothwell, A. G., Summers, K. L. (2006) *Tissue Antigens* **67**, 57-60
- 15) Zinser, E., Lechmann, M., Golka, A., Lutz, M. B., and Steinkasserer, A. (2004) *J. Exp. Med.* **200**, 345-351
- 16) Lechmann, M., Krooshoop, D. J., Dudziak, D., Kremmer, E., Kuhnt, C., Figdor, C. G., Schuler, G., and Steinkasserer, A. (2001) *J. Exp. Med.* **194**, 1813-1821
- 17) Hirano, N., Butler, M. O., Xia, Z., Ansen, S., von Bergwelt-Baildon, M. S., Neuberg, D., Freeman, G. J., and Nadler, L. M. (2006) *Blood* **107**, 1528-1536
- 18) Chen, L., Zhu, Y., Zhang, G., Gao, C., Zhong, W., and Zhang, X. (2011) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108**, 18778-18783
- 19) Scholler, N., Hayden-Ledbetter, M., Hellström, K.-E., Hellström, I., and Ledbetter, J. A. (2001) *J. Immunol.* **166**, 3865-3872
- 20) Baumgarth, N. (2011) *Nat. Rev. Immunol.* **11**, 34-46
- 21) Velupillai, P., Secor, W. E., Horauf, A. M., and Harn, D. A. (1997) *J. Immunol.* **158**, 338-344
- 22) Montecino-Rodriguez, E., and Dorshkind, K. (2012) *Immunity* **36**, 13-21

- 23) Berland, R., and Wortis, H. H. (2002) *Annu. Rev. Immunol.* **20**, 253-300
- 24) Arnold, J. N., Wormald, M. R., Suter, D. M., Radcliffe, C. M., Harvey, D. J., Dwek, R. A., Rudd, P. M., and Sim, R. B. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 29080-29087
- 25) Simons, K., and Toomre, D. (2000) *Cell Biol.* **1**, 31-39
- 26) Gupta, N., and DeFranco, A. L. (2003) *Mol. Biol. Cell* **14**, 432-444
- 27) Cheng, P. C., Dykstra, M. L., Mitchell, R. N., and Pierce, S. K. (1999) *J. Exp. Med.* **190**, 1549-1560
- 28) Matsushita, T., Yanaba, K., Bouaziz, J. D., Fujimoto, M., and Tedder, T. F. (2008) *J. Clin. Invest.* **118**, 3420-3430
- 29) Bouaziz, J.-D., Yanaba, K., and Tedder, T. F. (2008) *Immunol. Rev.* **224**, 201-214
- 30) Sindhava, V., Woodman, M. E., Stevenson, B., and Bondada, S. (2010) *PLoS One* **5**, e11445
- 31) Sato, T., Ishikawa, S., Akadegawa, K., Ito, T., Yurino, H., Kitabatake, M., Yoneyama, H., and Matsushima, K. (2004) *Eur. J. Immunol.* **34**, 3346-3358
- 32) Hayakawa, K., Asano, M., Shinton, S. A., Gui, M., Wen, L. J., Dashoff, J., and Hardy, R. R. (2003) *J. Exp. Med.* **197**, 87-99

Analysis of ligands for CD83, a marker of activated immune cells

Yusuke ANDO

Department of Microbiology, Hoshi University

CD83, a member of the immunoglobulin superfamily, is a type-1 transmembrane glycoprotein and expressed on various activated immune cells. The soluble form of CD83 strongly suppresses mixed lymphocyte reaction (MLR) and experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), however, the mechanism of CD83-mediated immune regulation including ligands for CD83 (CD83L) has not been elucidated. We screened immune cells from mouse lymphoid organs to identify CD83L⁺ cells by flow cytometry using a mCD83-Fc fusion protein, and found that mCD83-Fc bound to B220^{int}IgM^{hi}CD11b⁺ peritoneal B-1 B cells, but not to cells from spleen, bone marrow, or thymus. When we tested the binding of mCD83-Fc to various B lymphocytic cell lines, the fusion protein bound to BCL1-B20 cells which are known to be derived from B-1 B cells. The pull-down assay using mCD83-Fc revealed that a part of glycosylated IgM heavy chain was precipitated from the crude membrane fraction of BCL1-B20 cells. Furthermore, anti-mouse IgM antibodies blocked binding of mCD83-Fc to B-1 B cells and BCL1-B20 cells. These results suggest that CD83⁺ cells might recognize surface IgM with unique modification expressed on B-1 B cells during immune responses.